applied biosystems by life technologies

CE IVD

TrueScience™ RespiFinder® Identification Panels

FICHE DE CONSULTATION RAPIDE

⚠ Pour obtenir des instructions en matière de sécurité et de risques biologiques, consulter la section « Safety » du *TrueScience*™ *RespiFinder® Identification Panels Protocol* (PN 4460429). Pour les avertissements et précautions, consulter *TrueScience*™ *RespiFinder® Identification Panels Product Insert* (PN 4460486). Concernant tous les produits chimiques, lire la fiche signalétique et suivre les consignes de manipulation. Porter des protections oculaires, des gants et des vêtements appropriés. Pour plus d'informations sur *TrueScience*™ RespiFinder® Identification Panels, voir **www.appliedbiosystems.com/respifinderlit**. Pour télécharger les manuels de l'utilisateur *TrueScience*™ RespiFinder® Identification Panels, voir **www.appliedbiosystems.com/respifinderlit**, puis sélectionner l'onglet **Literature/Support**.

Cette fiche de consultation rapide traite des sujets suivants :

- Panels 1
- Description et principes du produit 1
- Utilisation prévue 2
- Assistance 2
- Avant de commencer : procédures non répétitives 2
- Procédure 3

Panels

Cette fiche de consultation rapide traite des *TrueScience*™ RespiFinder® Identification Panels suivants :

REF	Panel	Σ	Conservation
4460381	*TrueScience*™ RespiFinder® 15 Viral Identification Panel	50 tests	
4460382	*TrueScience*™ RespiFinder® 19 Pathogen Identification Panel	50 tests	

Description et principes du produit

Les *TrueScience*™ RespiFinder® Identification Panels utilisent un test PCR multiplex permettant de détecter et de différencier les agents pathogènes pouvant entraîner des infections des voies respiratoires. Le dosage des *TrueScience*™ RespiFinder® Identification Panels inclut une phase de transcription inverse/PCR combinée (pour convertir un ARN viral en ADN complémentaire et pour amplifier l'ADN/ADNc cible), une phase d'hybridation de sonde et une phase de ligature/amplification de sonde. Un Internal Amplification Control (IAC) est inclus dans le dosage afin de différencier les échantillons vrais négatifs des faux négatifs générés par une dégradation d'acide nucléique, une inhibition de PCR ou des erreurs de manipulation. Les cibles peuvent être détectées via l'analyse d'un fragment d'identification ADN utilisant l'électrophorèse capillaire. Pour plus d'informations, voir le *TrueScience*™ *RespiFinder® Identification Panels Protocol* (PN 4460429).

Panel	Agents pathogènes détectés	Nombre d'ensembles de sondes cibles	Gamme de tailles de sonde
TrueScience™ RespiFinder® 15 Viral Identification Panel	14 virus à ARN et 1 virus à ADN	15 plus IAC	163 à 498 nucléotides
TrueScience™ RespiFinder® 19 Pathogen Identification Panel	14 virus à ARN, 1 virus à ADN et 4 bactéries	19 plus IAC	

Utilisation prévue

Les *TrueScience*™ RespiFinder® Identification Panels sont des essais qualitatifs multiparamètres conçus pour détecter et identifier simultanément des agents pathogènes respiratoires communs à partir d'acides nucléiques totaux purifiés.

L'échantillon d'entrée est constitué d'acides nucléiques totaux extraits et purifiés issus de sécrétions rhinopharyngées prélevées par écouvillonnage, d'aspirations nasales, d'expectorations et de lavages broncho-alvéolaires (LBA) sur des patients suspectés de souffrir d'infections des voies respiratoires. La préparation d'échantillons cliniques est un processus distinct du champ d'action des panels. Utiliser des méthodes ou des produits adaptés pour manipuler les échantillons, puis extraire et purifier les acides nucléiques.

Les *TrueScience*™ RespiFinder® Identification Panels contribuent à poser le diagnostic d'infection des voies respiratoires lorsqu'ils sont utilisés conjointement avec d'autres résultats cliniques et de laboratoire. Des résultats négatifs ne sont pas forcément le signe de l'absence d'une infection virale ou bactérienne des voies respiratoires. Des résultats négatifs ne doivent pas être utilisés comme seule base pour un diagnostic, un traitement ou autres décisions thérapeutiques. Des résultats positifs n'excluent pas une co-infection avec d'autres agents pathogènes. Le ou les agents pathogènes détectés peuvent ne pas être la cause précise d'une pathologie. D'autres tests de laboratoire et l'évaluation d'une présentation clinique doivent être inclus dans le diagnostic final. Des caractéristiques de performance ont été établies avec des panels EQA validés sur **www.qcmd.org**. Ce produit est destiné à un usage par des professionnels des laboratoires et est conçu pour une utilisation avec certains instruments et logiciels d'analyse de données Life Technologies.

Assistance

Pour obtenir les dernières informations sur les services et le support technique dans tous les pays, visiter le site **www.appliedbiosystems.com** et cliquer sur **Support** ou bien contacter le représentant Life Technologies local.

Avant de commencer : procédures non répétitives

Préparation des zones de travail

Pour empêcher la contamination, il est fortement recommandé de réaliser les activités expérimentales dans des zones séparées. Se reporter au *TrueScience*™ *RespiFinder*® *Identification Panels Protocol* (PN 4460429) pour obtenir de plus amples informations.

Programmation du cycleur thermique

Programmer le cycleur thermique à l'aide des trois programmes suivants :

1. Transcription inverse et programme PCR			2. Programme d'hybridation de sonde			3. Ligature et programme PCR		
Phase	**Temp**	**Durée (mm:ss)**	**Phase**	**Temp**	**Durée (mm:ss)**	**Phase**	**Temp**	**Durée (mm:ss)**
Transcription inverse	50 °C	30:00	Dénaturation ADN	98 °C	10:00	Ligature de sonde	54 °C	15:00
Activer démarrage à chaud Taq	95 °C	15:00	Hybridation de sonde	60 °C	60:00	Dénaturation initiale	95 °C	2:00
Cyclage : 30 cycles	94 °C	00:30	Pause	60 °C	Passer directement à la phase suivante	Cyclage : 33 cycles	94 °C	0:30
	55 °C	00:30					60 °C	0:30
	72 °C	01:00					72 °C	1:00
Pause	20 °C	Passer directement à la phase suivante ou stocker†				Pause	20 °C	Passer directement à l'électrophorèse capillaire ou stocker†

† Stocker à 4 °C pendant un maximum de 1 semaine ou à –20 °C pour des périodes plus longues.

Configuration du logiciel de collecte de données

Avant d'utiliser les *TrueScience*™ RespiFinder® Identification Panels pour la première fois, configurer 3130/3130*xl* Data Collection Software v3.0 ou v3.1 ou 3500 Data Collection Software v1.0. Pour obtenir des instructions, se reporter au *TrueScience™ RespiFinder® Identification Panels Software Setup and Data Analysis User Guide* (PN 4460428). Pour télécharger le manuel de l'utilisateur, voir **www.appliedbiosystems.com/respifinderlit**, puis sélectionner l'onglet **Literature/Support**.

Procédure

1 Extraire les acides nucléiques totaux, puis ajouter Internal Amplification Control (IAC) aux échantillons lysés

a. Collecter des échantillons cliniques. Se reporter au *TrueScience™ RespiFinder® Identification Panels Protocol* (PN 4460429) pour obtenir des directives.

b. (Recommandé) Préchauffer les échantillons s'ils sont visqueux et/ou contiennent des composants cellulaires solides. Se reporter au *TrueScience™ RespiFinder® Identification Panels Protocol* (PN 4460429) pour obtenir des informations.

c. Extraire les acides nucléiques totaux (ARN et ADN) à l'aide d'une méthode d'extraction adéquate en suivant les instructions du fabricant. Se reporter au *TrueScience™ RespiFinder® Identification Panels Protocol* (PN 4460429) pour consulter des méthodes d'extraction validées. Pour la plupart des méthodes d'extraction, il est recommandé d'utiliser 200 µL de matériau d'échantillon et d'éluer dans 100 µL de tampon d'élution.

d. Après incubation de l'échantillon avec le tampon de lyse, ajouter Internal Amplification Control (IAC), puis bien mélanger. Ajouter 5 µL d'IAC pour chaque 100 µL de tampon d'élution.

IMPORTANT ! Pour tous les protocoles d'extraction, ajouter l'IAC *après* que l'incubation de l'échantillon avec le tampon de lyse est terminée. L'ajout d'IAC au mélange échantillon/tampon de lyse avant la fin de l'incubation peut entraîner une dégradation de l'IAC par les RNase et DNase dans l'échantillon, générant de faux négatifs. Le tampon de lyse inhibe les RNase et DNase et empêche la dégradation de l'IAC.

2 Préparer et pipetter le RT/PCR Mix

a. Dégeler les éléments suivants, puis les conserver sur de la glace.

- Modèle d'acide nucléique total (ARN et ADN)
- Dilution Buffer
- 5X RT-PCR Buffer
- Pre-Amplification Primer Mix
- dNTP Mix

b. Préparer une quantité suffisante de RT/PCR Mix pour le nombre d'échantillons à traiter plus un volume supplémentaire pour les pertes se produisant pendant le pipettage. Lors de la préparation du mélange, suivre les directives de manipulation spécifiques à ce réactif :

- Pour le RT-PCR Enzyme Mix : sortir le mélange du stockage immédiatement avant le pipettage. Centrifuger le mélange pendant 5 secondes, puis mélanger en retournant doucement la pipette. Utiliser des embouts de pipette à faible rétention lors de la manipulation du mélange. Replacer le mélange dans le lieu de stockage immédiatement après utilisation.
- Pour tous les autres réactifs et pour le modèle d'acide nucléique total : immédiatement avant utilisation, passer les tubes au vortex et les centrifuger brièvement.

Composants du RT/PCR Mix	Volume par réaction
Dilution Buffer	5,5 µL
5X RT-PCR Buffer	5,0 µL
Pre-Amplification Primer Mix	2,5 µL
dNTP Mix	1,0 µL
RT-PCR Enzyme Mix	1,0 µL
Volume total de RT/PCR Mix par réaction	**15 µL**

c. Passer brièvement au vortex le RT/PCR Mix, placer 15 µL dans des tubes PCR de 0,2 mL, puis fermer les tubes. Conserver les tubes PCR sur de la glace.

3 Préparer et pipetter le Probe Hybridization Mix

a. Dégeler le Dilution Buffer, le Hybridization Buffer et le Probe Mix, puis conserver ces éléments sur de la glace.

b. Préparer une quantité suffisante de Probe Hybridization Mix pour le nombre d'échantillons à traiter plus un volume supplémentaire pour les pertes se produisant pendant le pipettage.

Remarque : Immédiatement avant utilisation, passer chaque réactif au vortex et le centrifuger brièvement.

Composants du Probe Hybridization Mix	Volume par réaction
Dilution Buffer	3,0 µL
Hybridization Buffer	1,5 µL
Probe Mix	1,5 µL
Volume total de Probe Hybridization Mix par réaction	**6,0 µL**

c. Pipetter 6 µL de Probe Hybridization Mix dans de nouveaux tubes PCR de 0,2 mL, fermer les tubes, puis conserver les tubes PCR à 4 °C jusqu'à utilisation.

4 Configurer et réaliser une transcription inverse et PCR

a. Ajouter 10 µL de modèle d'acide nucléique total à chaque tube PCR qui contient 15 µL de RT/PCR Mix. Bien mélanger le contenu en retournant doucement la pipette, puis centrifuger brièvement.

Conserver les tubes PCR sur de la glace jusqu'au préchauffage du cycleur thermique.

Remarque : Si les procédures de laboratoire internes imposent la réalisation d'un contrôle négatif, ajouter 0,25 µL d'Internal Amplification Control à 10 µL d'eau exempte de DNase/RNase, puis ajouter ce mélange dans un tube PCR contenant 15 µL de RT/PCR Mix.

b. Lancer le programme du cycleur thermique Transcription inverse/PCR. Lorsque la température atteint 50 °C, placer les tubes PCR dans le cycleur thermique.

5 Configurer et réaliser une hybridation de sonde

a. Ajouter 100 µL d'eau stérile (non fournie) à chaque réaction transcription inverse/PCR, puis bien mélanger en retournant doucement la pipette.

b. Ajouter 2 µL de la réaction transcription inverse/PCR diluée à chaque tube qui contient 6 µL de Probe Hybridization Mix, puis centrifuger brièvement.

c. Placer les tubes PCR dans le cycleur thermique, puis réaliser le programme d'hybridation de sonde.

IMPORTANT ! Au cours des 60 dernières minutes d'hybridation de sonde, préparer le TwoStep Mix. Après l'hybridation de sonde, procéder immédiatement à la ligature puis à la réalisation PCR. Maintenir les tubes PCR dans le cycleur thermique à 60 °C jusqu'à être prêt à procéder à la ligature et la réalisation PCR.

6 (En cours d'hybridation de sonde) Préparer le TwoStep Mix

Au cours des 60 dernières minutes d'hybridation de sonde, préparer le TwoStep Mix :

a. Dégeler le TwoStep Buffer, puis le conserver sur de la glace.

b. Préparer une quantité suffisante de TwoStep Mix pour le nombre d'échantillons à traiter plus un volume supplémentaire pour les pertes se produisant pendant le pipettage. Conserver le mélange sur de la glace jusqu'à utilisation. Lors de la préparation du mélange, suivre les directives de manipulation spécifiques à ce réactif :

- Pour Ligase Enzyme et Taq Polymerase : sortir chaque réactif du stockage immédiatement avant le pipettage. Centrifuger chaque réactif pendant 5 secondes, puis mélanger chaque réactif en retournant doucement la pipette. Utiliser des embouts à faible rétention lors de la manipulation de ces réactifs. Replacer les réactifs dans le lieu de stockage immédiatement après utilisation.

- Passer au vortex et centrifuger brièvement le TwoStep Buffer avant le pipettage.

Composants du TwoStep Mix	Volume par réaction
TwoStep Buffer	30,6 µL
Ligase Enzyme	1,0 µL
Taq Polymerase	0,4 µL
Volume total de TwoStep Mix par réaction	**32,0 µL**

7 **(Immédiatement après l'hybridation de sonde) Configurer et réaliser la ligature et PCR**

Immédiatement après la réalisation de l'hybridation de sonde :

a. Arrêter le programme d'hybridation de sonde et démarrer immédiatement le programme de ligature et PCR.

b. Lorsque le cycleur thermique atteint 54 °C, appuyer sur **Pause** pour maintenir la température du bloc du cycleur thermique à 54 °C.

c. Préparer les réactions de l'hybridation de sonde pour la ligature et PCR :

1. Sortir les réactions d'hybridation de sonde du cycleur thermique.
2. Ajouter 32 µL de TwoStep Mix à chaque 8 µL de réaction d'hybridation de sonde.
3. Remettre les tubes dans le cycleur thermique.

Remarque : En cas de réalisation d'un grand nombre de réactions, réaliser la phase 7c par lots. Par exemple, en cas d'utilisation de tubes à 8 bandes, sortir 8 réactions, ajouter le TwoStep Mix, puis replacer les tubes dans le cycleur thermique avant de sortir les 8 réactions suivantes.

d. Redémarrer immédiatement le programme de ligature et PCR mis en pause.

8 **Procéder à une électrophorèse capillaire**

a. Combiner un étalon de masse, du formamide et un produit PCR :

1. Combiner les éléments suivants, puis mélanger soigneusement. Préparer un volume suffisant pour le nombre d'échantillons à traiter plus un volume supplémentaire pour les pertes se produisant pendant le pipettage :

Composants du Size Standard Mix	Volume par réaction (produit PCR ou reference marker)
GeneScan™ 600 LIZ™ Size Standard (PN 4366589)	0,5 µL
Hi-Di™ Formamide (PN 4311320)	10,0 µL
Volume total de Size Standard Mix par réaction	**10,5 µL**

2. Dans une plaque optique à 96 puits, pipetter 10,5 µL du Size Standard Mix dans chacun des nombre requis de puits.
3. (Recommandé) Pipetter 1 µL de Reference Marker (FAM™) dans un des puits contenant le Size Standard Mix. Utiliser la pipette pour mélanger.
4. Pour chaque échantillon de produit PCR :
   - Diluer 5 µL de produit PCR échantillon dans 45 µL d'eau désionisée.
   - Pipetter 1 µL du produit PCR échantillon dilué dans un puits contenant le Size Standard Mix, puis utiliser la pipette pour mélanger.

   Remarque : Dans certains cas (par exemple, charge virale élevée), il peut être nécessaire de diluer encore le produit PCR afin d'éviter les pics hors échelle. Pour plus d'informations, voir *TrueScience*™ *RespiFinder*® *Identification Panels Protocol*.
5. Sceller la plaque avec un couvercle adéquat.

b. Lancer le cycle de la plaque d'échantillons

1. Centrifuger la plaque à 1 000 × g pendant 10 secondes pour diriger le liquide vers le fond des puits et supprimer les bulles d'air.
2. Charger la plaque dans l'analyseur génétique, configurer le logiciel de collecte de données comme décrit dans le *TrueScience™ RespiFinder® Identification Panels Software Setup and Data Analysis User Guide* (PN 4460428), puis lier la plaque et démarrer le cycle.

9 Analyser et interpréter des données

Procéder à l'identification du statut du candidat pathogène en analysant des données à l'aide des ensembles de réceptacles, panels et paramètres d'analyse recommandés. Pour obtenir des instructions, se reporter au *TrueScience™ RespiFinder® Identification Panels Software Setup and Data Analysis User Guide* (PN 4460428).

Life Technologies recommande à chaque laboratoire de développer ses propres procédures et critères d'interprétation et de rapports.

Not for sale in U.S.A.

Avis de non-responsabilité

Les résultats obtenus à l'aide de ces panels de diagnostic, ou de tout autre, doivent être utilisés et interprétés uniquement dans le contexte du tableau clinique global. Life Technologies ne peut accepter aucune part de responsabilité pour aucune décision clinique prise.

Life Technologies ne présente pas ce guide comme résumé complet de tous les résultats possibles liés à l'utilisation des *TrueScience*™ RespiFinder® Identification Panels. Ce guide est conçu uniquement pour une utilisation en tant qu'aide-mémoire. Il ne peut être utilisé pour aucune interprétation clinique des résultats d'un dosage. Les laboratoires doivent interpréter et rapporter les résultats du dosage conformément à leurs propres procédures développées localement.

Information in this document is subject to change without notice.

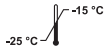
APPLIED BIOSYSTEMS DISCLAIMS ALL WARRANTIES WITH RESPECT TO THIS DOCUMENT, EXPRESSED OR IMPLIED, INCLUDING BUT NOT LIMITED TO THOSE OF MERCHANTABILITY OR FITNESS FOR A PARTICULAR PURPOSE. TO THE FULLEST EXTENT ALLOWED BY LAW, IN NO EVENT SHALL APPLIED BIOSYSTEMS BE LIABLE, WHETHER IN CONTRACT, TORT, WARRANTY, OR UNDER ANY STATUTE OR ON ANY OTHER BASIS FOR SPECIAL, INCIDENTAL, INDIRECT, PUNITIVE, MULTIPLE OR CONSEQUENTIAL DAMAGES IN CONNECTION WITH OR ARISING FROM THIS DOCUMENT, INCLUDING BUT NOT LIMITED TO THE USE THEREOF, WHETHER OR NOT FORESEEABLE AND WHETHER OR NOT APPLIED BIOSYSTEMS IS ADVISED OF THE POSSIBILITY OF SUCH DAMAGES.

Symboles utilisés sur les étiquettes et les emballages :

FABRICANT

NOMBRE DE TESTS

CONSULTER LE MODE D'EMPLOI



STOCKER À LA TEMPÉRATURE INDIQUÉE

UTILISER AVANT LA DATE INDIQUÉE

RÉFÉRENCE CATALOGUE

NUMÉRO DE LOT

Life Technologies™ Ltd.
7 Kingsland Grange
Woolston, Warrington, WA1 4SR, United Kingdom
www.appliedbiosystems.com/respifinderlit

NOTICE TO PURCHASER: This product is a RespiFinder product manufactured by PathoFinder B.V. in Maastricht, The Netherlands within quality systems accredited to ISO13485:2003.

These products are sold for use by the end-user only and may not be re-sold, distributed or re-packaged.

LIMITED USE LABEL LICENSE: No right to resell this product or any of its components is conveyed expressly, by implication, or by estoppel. For information on obtaining additional rights, please contact **outlicensing@lifetech.com** or Out Licensing, Life Technologies, 5791 Van Allen Way, Carlsbad, California 92008.

Trademarks: The trademarks mentioned herein are the property of Life Technologies Corporation or their respective owners. RespiFinder is a registered trademark of PathoFinder B.V.

LES *TRUESCIENCE*™ RESPIFINDER® IDENTIFICATION PANELS SONT FOURNIS POUR DES TESTS DE DIAGNOSTICS IN VITRO PROFESSIONNELS. CE PRODUIT NE FOURNIT PAS UNE LICENCE PERMETTANT D'EXÉCUTER PCR CONFORMÉMENT AUX BREVETS DÉTENUS PAR UN TIERS, DONT HOFFMANN-LA ROCHE (HOFFMANN-LA ROCHE LTD, DIAGNOSTICS, CH-4070 BASEL, SWITZERLAND) ET ROCHE MOLECULAR SYSTEMS, INC (ROCHE MOLECULAR SYSTEMS, INC., 1145 ATLANTIC AVENUE, ALAMEDA, CALIFORNIA 94501).

Le client est responsable de la validation des dosages et de la conformité avec les exigences réglementaires applicables aux procédures et utilisations des produits RespiFinder.

© 2011 Life Technologies Corporation.. All rights reserved.

Part Number 4461372 Rev. B 07/2011 Translated from the English PN 4460430 Rev. A

applied biosystems®
by life technologies™

Headquarters
5791 Van Allen Way | Carlsbad, CA 92008 USA
Phone 760.603.7200
www.lifetechnologies.com

Technical Resources and Support
For the latest technical resources and support information for all locations, please refer to our Web site at
www.appliedbiosystems.com